

Produção de mutações na "*Drosophila pseudo-obscura*", por meio de temperaturas elevadas

POR

A. DE SOUSA DA CAMARA

Professor do Instituto Superior de Agronomia

Com o desenvolvimento da Genética surgiu a possibilidade de fazer intervir no ataque ao problema da evolução os métodos experimentais e de análise que àquela são peculiares. O estudo dos processos evolutivos, que a princípio se apoiara quasi exclusivamente em doutrinas meramente especulativas, deslocou-se assim para um outro plano. Às concepções arrojadas, às doutrinas brilhantes, produto muitas vezes duma visão genial, sucederam-se por fim as simples investigações laboratoriais, visando a obtenção daquilo que parecia desde logo essencial—um método experimental de análise ao fenómeno da evolução.

Era natural, porém, que frente à dificuldade do objectivo, aos inúmeros aspectos ainda mal conhecidos porque se desdobra este assunto, se mantivesse a maior prudência na execução dos ensaios e se olhasse com a maior reserva—quasi se diria com a mais justificada desconfiança—todos os resultados que pouco a pouco se fôsem obtendo. Assim se compreende a série de críticas que despertaram e têm despertado as investigações genéticas realizadas com este fim. E contudo já ninguém pode duvidar da contribuição poderosa que a genética deu à resolução deste problema. Quando conseguiu estabelecer que só os caracteres aparecidos como mutantes são transmissíveis por hereditariedade, e quando, por esta razão, pôde precisar que estes, sobretudo, derivados a princípio da simples variação dum factor, desempenham papel no processo evolutivo, a genética pôde aclarar duma maneira decisiva o campo que mais interessava explo-

rar na linha geral das investigações ligadas à evolução:—A ORIGEM DAS MUTAÇÕES FACTORIAIS.

Infelizmente, a-pesar-da clareza com que se delimitou o âmbito do problema, as dificuldades deparadas na sua resolução apresentaram-se logo de natureza tão complexa que se viu a necessidade de restringir as pesquisas e de procurar primeiro um horizonte mais limitado, mais facilmente explorável e oferecendo possivelmente resultados mais seguros. Assim, em lugar de se procurar imediatamente a «origem», procurou-se simplesmente um «MEIO DE PRODUÇÃO ARTIFICIAL DE MUTAÇÕES».

Tentou-se depois por todas as formas que este «meio» produzisse não só mutações, mas certas e orientadas segundo uma direcção particular. Não obstante as dificuldades encontradas na descoberta deste agente que deveria ser eficiente, rápido nos seus efeitos e facilmente regulável na intensidade da sua acção, muito se fez já, tanto com recurso a determinadas *radiações* como a *elevadas temperaturas*. Tanto num como noutro caso se tem conseguido fazer aparecer não só os mesmos mutantes já conhecidos, como mutantes novos e até em certos casos—conforme se tem apregoadado—mutantes com determinada direcção.

Há evidentemente, entre todas as experiências conhecidas, na massa de dados que as mesmas já formaram, numerosos pontos a aclarar, aspectos que se conservam ainda imprecisos e que importa definir, resultados estranhos que não lograram justificação cabal e que têm de ser confirmados e explicados. Por este motivo é forçoso desenvolver toda uma série dilatada de investigações, quer seguindo técnicas já praticadas, mas em diversas espécies, quer tentando mesmo novos métodos ou outros agentes de tratamento. E parece possível, se não provável, que nesses trabalhos, tendentes à generalização, se chegue não só à confirmação de conclusões aparentemente discutíveis, como até, o que seria de maior utilidade, a novos factos que dêem outras directrizes em uma linha inexplorada de pesquisas. Por estas razões se podem proclamar necessários e do maior interesse os trabalhos realizados neste campo, que permitam alcançar por fim, à custa de repetições ou de ensaios paralelos, segundo as mesmas modalidades ou modalidades distintas—a generalização dos primeiros resultados obtidos no capítulo da «Produção artificial de mutações».

Presentemente, depois das contribuições dadas, é já inútil enca-

recer a importância dos estudos da mutação induzida na discussão e interpretação do fenómeno evolutivo. É bem conhecido o alcance profundo que êles têm denotado na averiguação dos problemas complexos ligados à natureza do gene. E é sabido que entre estes sobressai, como questão fundamental, o de averiguar se a mutação factorial se executa desordenadamente ou se pelo contrário ela decorre segundo direcções definidas.

Agora, o problema capital, de resolução aliás árdua e espinhosa, consiste em estudar os efeitos de sucessivas variações sobre a mesma unidade hereditária. Compreende-se que se estas investigações puderem ser empreendidas com êxito acabar-se-á por formular os princípios em que assenta a evolução orgânica.

Não nos importa, na presente revisão, criticar as diversas hipóteses mais ou menos valiosas, que se têm apresentado sobre a natureza do gene e genovariabilidade.

Em nosso critério são ociosas as discussões sobre este tema quando tendem apenas a deduzir se a genovariabilidade deriva de variações quantitativas ou qualitativas do gene, ou se resulta mesmo de ambas.

A soma de trabalhos acumulados não é por emquanto bastante, em nossa opinião, para formular conclusões precisas. Demais, não é esta deficiência de conhecimentos que pode prejudicar a interpretação de resultados experimentais semelhantes aos que apresentamos neste relato.

Ignoramos ainda quais são os agentes que produzem as variações naturais dos genes. Sabemos, somente, que estas mutações ocorrem na natureza em relativa baixa frequência, e que esta frequência é diversa em genes diferentes. Emquanto há genes duma considerável mutabilidade, há outros que são essencialmente estáveis.

É este o facto que fundamentalmente nos tem de preocupar nesta casta de trabalhos. E contudo torna-se necessário não esquecer algumas das sugestões feitas, as quais poderão vir a esclarecer ou encaminhar as pesquisas. Há interesse, por exemplo, em lembrar a afirmação bem conhecida de que a mutação factorial não é mais do que resultado de simples arranjos intragénicos, capazes de modificar a estrutura físico-química do gene. Torna-se ainda conveniente ter presente a explicação de Goldschmidt (1929) sobre mutações factoriais su-

pondo-as exclusivamente resultantes de variações quantitativas do gene.

Embora tais sugestões se mostrem dignas de atenção, por virem descortinar um pouco, em explicações quasi intuitivas, o horizonte demasiado obscuro da possível natureza das variações sofridas, pela unidade hereditária, há que as sujeitar à necessária crítica, olhá-las como simples hipóteses, considerá-las enfim com a reserva a que todo o biologista se obriga. Realmente se aceitássemos completamente a célebre hipótese da «presença-ausência» de Bateson ou a idea de Goldschmidt de que as mutações não eram mais do que «*variações quantitativas do gene*» seríamos forçados a concluir que a *mutabilidade não passava dum simples processo de degradação génica* (Timoféeff-Ressovsky, 1932). Isto é, tornar-se-ia impossível a reversão de mutantes factoriais. Ora a experimentação de Timoféeff-Ressovsky provou que as genovariedades não são em geral perdas do material génico específico, altamente diferenciado.

A evidência de que as mutações factoriais se podem dar em direcções opostas (Demerec, 1931), verificando-se tanto a partir do tipo selvagem para o mutante como dêste para aquele, tem levado a acreditar que tais variações são resultantes de simples processos químicos.

Demerec sugeriu recentemente (1933) que os genes são simples moléculas orgânicas. Quer dizer que, dêste modo, as variações em um ou mais átomos, que constituiriam as moléculas do gene, deveriam ocasionar variações profundas em todo o complexo. Se assim fôsse justificar-se-ia tanto a mutação suposta desordenada, como a mutação ordenada em determinados «loci».

O nosso trabalho é uma contribuição para o estudo da *genovariabilidade ou mutabilidade de genes*, em uma espécie de «*Drosophila*». Com êste objectivo decidimos tentar a produção artificial de mutações numa espécie ainda mal estudada, sob êste ponto de vista— a «*Drosophila pseudo-obscura*». Como a acção dos Raios X já havia sido experimentada nesta espécie (Schultz, 1933), deliberámos pesquisar apenas os efeitos de temperaturas elevadas, segundo o método ensaiado na «*Drosophila melanogaster*».

As razões que nos aconselharam a escolha dêste meio prendem-se não só com o seu alto interêsse na análise do processo evo-

lutivo, mas também no facto de, em nosso conhecimento, não terem ainda sido confirmados, em qualquer espécie de «*Drosophila*», os resultados brilhantemente obtidos na «*Drosophila melanogaster*».

Têm sido numerosos os investigadores que utilizaram, para esta última espécie, as altas temperaturas como meio de provocar mutações. Goldschmidt (1929), Jollos (1930, 1931, 1932), Rockizky (1930), Grossman e Smith (1933), Plough e Ives (1932, 1933) conseguiram realmente verificar o aparecimento de mutantes após o tratamento das larvas pelo calor.

O interesse que as primeiras conclusões revelaram foi-se assim avolumando, logrando chamar a atenção geral dos biólogos e conseguindo provocar investigações mais vastas e de alcance talvez mais proveitoso para o estudo complicado do gene.

Evidentemente, entre tantas tentativas realizadas, é bem compreensível que não haja inteira concordância de pontos de vista. É mesmo de admitir que alguns dos resultados sejam negativos, como são, por exemplo, os de Ferry, Shapiro e Sidoroff (1930).

As divergências encontradas, embora constituam mais um estímulo para investigações similares, como as que empreendemos, devem encontrar fácil explicação nas diferenças de técnicas adoptadas, na escolha do material de trabalho e também nos factores psicológicos dos observadores, nem sempre dotados da percepção aguda necessária à descoberta de numerosos mutantes.

Entretanto, nos últimos trabalhos executados neste plano, devidos a Plough e Ives (1933), reconheceu-se mais uma vez que *submetendo larvas a temperaturas sub-letais se verifica sempre um acréscimo natural no número de mutações, nas gerações resultantes dos indivíduos expostos.*

O conhecimento desta influência, de tão alta valia no ataque ao problema experimental da evolução, na sua discussão e até na interpretação de certos problemas genéticos, levou-nos, como dissemos, a estudar o comportamento da «*Drosophila pseudo-obscura*», perante este tratamento.

Parece de facto interessante e útil repetir nesta espécie os trabalhos já efectuados na «*Drosophila melanogaster*». No estudo das relações das diferentes espécies e do seu aparecimento parece que a investigação referida se pode revestir duma importância particular.

Realmente, se fôsse verdadeira a suposição (Koller, 1932) de que uma parte do cromosoma X da «*Drosophila pseudo-obscura*» deriva dum autosoma, o estudo que nos preocupa, deliberadamente

restringido à mutação induzida, poderia levar-nos a qualquer conclusão valiosa.

Impõe-se a realização de investigações paralelas de mutação induzida em tôdas as espécies da «*Drosophila*». Mas pela razão invocada, da origem do heterosoma, a «*Drosophila pseudo-obscura*» (e possivelmente pelo mesmo motivo a *D. hydei*) mostra-se como sendo uma das espécies que mais deve chamar a atenção. Por outro lado, a elevada extensão do mapa do cromosoma X, nesta espécie, o mais longo dos heterosomas em tôdas as espécies de «*Drosophila*», poderia revelar um comportamento distinto sob o ponto de vista da mutabilidade. Seria possível, por exemplo, ver verificado que a genovariação está relacionada à extensão cromosomática, ou melhor, poderia ser possível demonstrar, com recurso a agentes artificiais, que a extensão cromosomática é de qualquer modo responsável pela maior ou menor mutabilidade.

Sendo o nosso trabalho, como dissemos, uma contribuição para o estudo da genovariabilidade, não trataremos senão dum aspecto restrito da mutação, de *genovariações* ou *mutações factoriais*; e portanto não nos preocuparemos com os fenómenos mutacionais ligados a variações cromosômáticas. Não queremos, porém, significar, pela restrição que nos impomos, que tomamos a genovariabilidade como a única causa da evolução. É evidente que a mutação factorial é causa necessária da evolução. Mas é evidente também que não é suficiente.

Os casos mais notáveis e talvez mais brilhantes, até agora relatados, sobre o aparecimento repetido de mutações dos mesmos genes, são indiscutivelmente os devidos a Goldschmidt (1929) e a Jollos (1931).

O material que estes genetistas escolheram—a já citada «*Drosophila melanogaster*»—é de-certo muito mais favorável que a «*Drosophila pseudo-obscura*»—a espécie que entendemos escolher para as nossas investigações. Com o ser muito melhor estudada, sob o ponto de vista genético, conhecendo-se nela um número incomparavelmente superior de mutantes, a par de séries alelomórficas numerosas, a «*Drosophila melanogaster*» afigura-se-nos imediatamente como sendo espécie muito mais apropriada a êste género de pesquisas.

Os nossos ensaios, talvez por esta circunstância, não consegui-

ram resultados que pudessem confirmar integralmente os daqueles investigadores. É certo que o número, até agora atingido, de indivíduos observados, pouco superior a 90.000, não representa ainda uma cifra suficiente. Mas mesmo assim, sem inteira concordância de procedimentos, e sem observações exageradamente repetidas, os nossos dados têm já interesse por contribuírem declaradamente para a generalização do método.

Tratando-se duma espécie diferente, com períodos diversos no ciclo biológico, houve necessidade de modificar os tratamentos nas suas durações e intensidade. Tivemos por isso de experimentar diversas temperaturas em diversos tempos e até para diversas idades de larvas. A determinação foi, porém, enormemente dificultada pelo elevado número de factores que entram em jogo e que nem sempre podem ser devidamente considerados. Cremos, entretanto, que as directrizes obtidas nesta experimentação prévia satisfizeram na maioria dos casos.

Goldschmidl e Jollos determinaram, como temperaturas convenientes para actuar sobre larvas de «*Drosophila melanogaster*», 35° e 36° C. Nós verificámos, como adiante referiremos, que as temperaturas sub-letais para a «*Drosophila*» *pseudo-obscura* eram de 34° e 35° C. Naqueles estudos trataram-se larvas de 5 e 6 dias de idade. Nós julgámos mais conveniente submeter ao tratamento indivíduos de idades variáveis.

A temperatura citada de 35° C. corresponde a um tratamento excessivamente enérgico: há perda muito elevada de larvas e há simultâneamente esterilização dum número muito avultado de moscas. Mas é natural que se busque esta extrema *energia do tratamento*, no intuito de obter uma maior facilidade no aparecimento de mutações. Como é lógico tem-se suposto, e as experiências, mesmo as nossas, parecem confirmar—que a uma maior temperatura corresponde quasi sempre uma maior mutabilidade.

Parece ainda natural que uma acção tão violenta, por vezes eliminadora de grande parte dos indivíduos, tivesse conduzido alguns biólogos a discutir o mérito destes trabalhos, como elementos para o estudo da evolução.

Plate (1932) e Haldane (1933), por exemplo, traduziram essa corrente de opinião, afirmando que umas condições do meio tão severas levariam mais à eliminação duma espécie que a um passo particular da evolução.

Uma tal suposição poderá parecer algo exagerada, quando se

sabe que as temperaturas críticas, a que nos referimos, não são impossíveis nas condições naturais, antes pelo contrário se atingem com certa frequência.

A temperatura de 34° C., por exemplo, que determinámos ser sub-letal para a «*Drosophila*» pseudo-obscura, que achámos necessária para actuar sobre certos genes, é de ocorrência vulgar sob o nosso clima em determinados períodos.

Verdade é que Haldane (1933) admite que a alta frequência de mutações devida ao calor pode ter desempenhado um papel na evolução. Em seu critério pode mesmo ter chegado a causar realmente a evolução ortogenética das espécies, perto do limite tropical da sua distribuição. Pode ser, em boa verdade, parcialmente responsável pelo caso bem conhecido da maior diversidade das espécies das regiões tropicais, em confronto com o que se verifica nos *habitats* temperados e árticos.

Há de facto condições naturais que se assemelham às procuradas nos laboratórios, sob o ponto de vista particular das temperaturas. Por isso seria de certa importância certificarmo-nos até que ponto esta causa poderá influir, sem intervenção de outras, na mutabilidade e conseqüentemente no processo evolutivo.

Não cometemos o erro grosseiro de imaginar a temperatura o único ou o principal factor da evolução. Conquanto estejamos plenamente convencidos que a temperatura constitue—na fase actual dos nossos conhecimentos—a primeira e a mais útil ferramenta a que o genetista pode lançar mão, nas investigações de mutação induzida, não queremos de modo algum afirmar que a sua acção sobreleva a de quaisquer outros agentes, pela facilidade de utilização, pela energia ou mesmo pela sua eficácia. Naturalmente há outros casos, já averiguados, de rápida mutabilidade. Mas o que se tem mostrado é que essas genovariedades obtidas à custa de outros agentes ocorrem em geral em percentagem muito baixa.

A radioactividade natural, por exemplo, cuja explicação atraiu desde há muito as atenções dos genetistas, suscitando variadas pesquisas e discussões, tem-se evidenciado, através duma já longa série de pareceres, que é inadequada para justificar a frequência com que aparecem as mutações naturais. Muller e Mott-Smith (1930), Babcock e Collins (1929, a, b), Olson e Lewis (1928), Joly e Dixon (1929), entre outros, discutiram esta causa de mutações no intuito de inquirir da sua influência no processo da evolução orgânica. Ora pelas deduções estabelecidas é de conjecturar que algumas mutações tenham sido cau-

sadas pela radioactividade natural. Mas a proporção destas é forçosamente muito baixa, provavelmente menor que 1 para 1.000 (Muller e Mott-Smith, 1930). Parece por outro lado, que as radiações luminosas devam ter executado um papel semelhante. As investigações conduzidas por Baur e pelos seus assistentes confirmaram em parte esta suposição. Mas ainda é evidente que a mutabilidade obtida por estes processos é muito pouco pronunciada.

Há ainda um outro facto, freqüentemente mal considerado, que importa lembrar na evolução orgânica. Ficou realmente provado (Demerec, 1929) que há genes que influenciam a mutabilidade de outros. Significa isto que no processo evolutivo um desses genes pode ter desempenhado uma acção, evidentemente temporária, a qual persistiu enquanto não foi atingido um certo grau na mutabilidade, enquanto se não chegou ao equilíbrio conveniente, isto é, enquanto a mutabilidade foi favorável à selecção natural (Haldane, 1933).

Pelo que se sabe pode concluir-se que não há especificidade nos agentes apontados. Uns poderão ser aparentemente mais enérgicos e mais eficazes. Mas outros—e a temperatura mostra-se desde logo como o mais notável—supostos em geral e talvez erradamente menos eficientes, têm em compensação efeitos muito mais significativos.

Reconhecida a verdade desta afirmação, determinada a valia relativa destes agentes, ergue-se então o problema capital de examinar o fundamento da mutação induzida. Encontrar, porém, a sua solução equivale a determinar a natureza do gene. São estes afinal aspectos duma mesma questão. O seu desenvolvimento é claramente convergente, cada vez mais acentuado, e há-de chegar possivelmente a soluções simultâneas.

Nestas condições a complexidade da situação é tão evidente, tão difícil o estabelecimento de ensaios, tão espinhosa e tão ingrata a interpretação dos resultados, que ainda hoje se justifica plenamente a carência duma síntese perfeita, integradora final das conclusões acumuladas e das hipóteses propostas.

Tem-se afirmado que o mecanismo da mutação induzida assenta sobre o comportamento cromosómico (Just, 1932). Mas esta afirmação, aliás quasi intuitiva e plenamente demonstrada pelos efeitos dos Raios X ou dos raios γ do radium, não vem dar elementos novos à descoberta desse mecanismo.

Também se não pode supor que seja o poder de penetração das radiações luminosas, em atingir os cromosomas, responsável pelos seus efeitos.

E como consequência de ainda se conservar obscuro o mecanismo da mutação induzida, tem-se olhado com extrema reserva o alcance do seu estudo na consideração do processo evolutivo. Surgiram assim naturalmente dúvidas e apontaram-se os casos que mais importava esclarecer.

Não nos pode interessar, no presente trabalho, a revisão circunstanciada do que se tem sugerido sobre este problema. Todavia, para os intuítos da nossa discussão, convém mencionar os argumentos dum genetista que bem pode representar esse espírito de dúvida; e ver em seguida se estas ideias são de envergadura a abalar a suposição básica, que inteiramente perfilhamos, de que o *estudo da genovariabilidade é essencial no estudo da evolução*. Esse genetista Héribert Nilsson (1932) afirmou que a aparência de mutações com maior frequência, após tratamentos de radiações de alta energia ou temperaturas elevadas, era provavelmente causada por uma eliminação selectiva do tipo normal, o que permitiria o aparecimento de mais mutantes. E como exemplo, claramente demonstrativo, citava o caso duma linha de «*Drosophila melanogaster*», «*yellow-white*», que exposta a alta temperatura resistia muito melhor que uma linha selvagem submetida a idênticas condições. Ainda, para confirmar a sua opinião, lembrava que as sementes de «*Oenothera lamarckiana*», com vários anos de idade, tendo reduzido enormemente a sua viabilidade, mostram em contra-partida, nas poucas plantas que conseguem originar, uma elevada percentagem dos chamados mutantes.

À primeira suposta prova de H. Nilsson respondeu Muller (1932) afirmando que isso nada significava, que se a linha «*yellow-white*» tinha outra resistência é porque ela derivava duma invisível diferença génica de ordem puramente fisiológica.

Realmente, o que sucede correntemente, o que está quasi universalmente reconhecido, é que os individuos mutantes são incomparavelmente mais fracos que os do tipo selvagem. Isto é, justamente o oposto do citado por H. Nilsson. Nas nossas experiências, por exemplo, ao trabalharmos com uma linha mutante da «*Drosophila pseudo-obscura*», «*Pointed, yellow, vermillion, Knobby*», supusemos a princípio que ela sobrevivia muito melhor às elevadas temperaturas, que a população «selvagem» que havíamos tomado para testemunha. Mas só por este facto poder-se-ia porventura conferir à linha mutante a qualidade duma maior resistência? Evidentemente que não, e tanto que procurámos logo seleccionar entre as populações selvagens linhas de resistência a elevadas temperaturas. Realmente passado certo tempo

conseguíamos seleccionar algumas linhas incomparavelmente mais resistentes que a referida «Pointed, yellow, vermillion, Knobby».

Esta é a regra geral. Pode porém suceder, conforme Muller afirma, que cada sorte de mutante tenha a sua maneira específica de reacção, manifestando-se tanto a altas como a baixas temperaturas, tanto à secura como à humidade, etc. etc.

O outro exemplo da «*Oenothera*», citado por Nilsson, não tem quanto a nós maior valor. Em primeiro lugar, a natureza particular das mutações verificadas na «*Oenothera*» não permite que elas sejam comparadas a estes casos de mutação induzida, os quais são de mera genovariabilidade. Em segundo, finalmente, não vemos que de qualquer modo saia provado que a perda de poder germinativo seja menos comum nas sementes que hão-de dar origem a mutações. Quer parecer-nos simplesmente que não há aqui senão um caso de processo mutativo das sementes dormentes, sensivelmente idêntico àquele que Navashin e Shkvornikov ultimamente estudaram no «*Crepis tectorum*» (1933). Conforme foi afirmado por estes autores, na sua curiosa hipótese da origem metabólica da mutação, o enorme acréscimo na proporção de mutações não pode de modo algum atribuir-se à mortalidade selectiva.

Não se encontrando assim fácil justificação às dúvidas levantadas quanto ao alcance das pesquisas de mutação induzida, dúvidas aqui apresentadas pelas suposições de H. Nilsson, continuam tais investigações a merecer o interesse dos genetistas, dos campos mais variados. Não se vêem de facto razões que impeçam o prosseguimento de trabalhos desta índole. Pelo contrário, tudo indica que há absoluta necessidade de acumular sobre tal matéria a maior soma possível de informações.

O presente trabalho, primeiro relato das investigações empreendidas por nós no «Institute of Animal Genetics» da Universidade de Edimburgo e depois continuadas no nosso Laboratório do «Instituto Superior de Agronomia» de Lisboa, atinge já uma cifra relativamente importante de indivíduos examinados. Não cremos, porém, ainda possível tirar qualquer conclusão precisa sobre o significado da mutação induzida pelas altas temperaturas, na «*Drosophila pseudo-obscura*».

Nos resultados obtidos por vários investigadores da «*Drosophila melanogaster*», excepção feita dos de Jollos, aliás ainda não

confirmados, não encontramos possibilidade de concluir com rigorosa certeza qualquer princípio positivo que permita provar que na «*Drosophila melanogaster*» é possível provocar mutações dirigidas pelos tratamentos térmicos. Nós na «*Drosophila pseudo-obscura*» conseguimos idênticos resultados, demonstrando que ainda para esta outra espécie de «*Drosophila*» se pode utilizar com ligeiras modificações a técnica encontrada para a «*Drosophila melanogaster*»; mas ainda não conseguimos, como pretendíamos, provar a doutrina de Jollos relativamente à direcção da mutação. Temos evidentemente investigações em curso que já deram alguns resultados. Mas em face dos dados desorientadores que se têm verificado nada podemos ainda concluir. Por enquanto, como síntese do que nos foi dado averiguar, limitamo-nos a dizer:

1—Que nos foi possível e até relativamente fácil obter mutantes por tratamentos térmicos;

2—Que ainda nos não foi possível obter para a «*Drosophila*» pseudo-obscura confirmação integral dos resultados obtidos por Jollos, na «*Drosophila*» melanogaster, sobre a direcção da mutação.

Nos nossos ensaios verificou-se que o tratamento pelas temperaturas elevadas não modifica o processo da mutação. Esta dá-se como se ocorresse espontaneamente. Apenas a sua frequência é maior. Dir-se-ia que a mutabilidade é exaltada, levada a um grau incomparavelmente superior. Plough (1933) supõe mesmo que a elevada temperatura não tem efeito sobre a direcção da evolução. Entende que somente, pela razão de produzir mais mutantes, que se hão-de sujeitar à selecção natural, consegue acelerar o processo.

A princípio a técnica seguida nestes ensaios foi essencialmente a técnica indicada por Goldschmidt e mais tarde por Jollos, apenas modificada nas temperaturas, idades das larvas a tratar e duração de tratamento.

Mais tarde julgámos conveniente sujeitá-la a várias alterações introduzindo mesmo novas modalidades.

Depois das necessárias tentativas para determinar as temperaturas mais convenientes a que deveríamos submeter as nossas culturas, e depois duma larga experimentação, marcámos, como convenientes para estudo, as temperaturas de 33°, 34° e 35°, com durações variáveis de 18 a 12 horas.

Realizado um cruzamento, que era sempre repetido vinte vezes—utilizando apenas virgens e machos novos—aguardava-se que

decorressem cinco dias. Findo este tempo procedia-se às transferências para novos frascos; e ao cabo dos mesmos períodos de cinco dias iam-se repetindo sucessivamente as transferências até à morte dos genitores. Metade destas culturas era reservada para testemunhas e a outra metade era utilizada nos ensaios.

Tendo nós verificado que era essencial manter uniformes, nas diversas culturas, as condições de humidade, dispensámos os maiores cuidados à preparação dos meios nutritivos. Tentámos primeiramente meios nutritivos diversos, mas acabámos por adoptar exclusivamente o mais vulgarizado de «milho-agar-melaço».

Com o intuito de atingir a máxima regularidade, adoptámos sempre frascos de cultura da mesma capacidade—tubos de vidro de $4\frac{1}{2} \times 1$ —e enchêmo-los com a mesma quantidade aproximada de alimento. Entretanto, a despeito de todos os cuidados, da preocupação extrema que sempre tivemos em obter a máxima uniformidade das culturas, mostrou-se totalmente impossível alcançar a igualdade ideal das condições de humidade, tanto nas culturas sujeitas ao calor como nas que serviram de testemunhas.

A acção de choque térmico a que recorremos, exercida por uma única vez, ou repetidamente após intervalos de repouso, consoante as modalidades que se consideraram e que ainda estão em experimentação, deu resultados indiscutivelmente eficazes quanto à produção de mutantes.

Contudo, estes resultados mostraram-se, desde o começo, de tal maneira desorientadores que ainda não podemos fazer qualquer referência aos dados colhidos, com as técnicas ultimamente ensaiadas.

Como era natural, ao considerarmos novos métodos de trabalho, procurámos dar às culturas tratamentos que ainda aproximassem mais as condições laboratoriais das que por vezes ocorrem na natureza. Há, porém, grandes dificuldades em conseguir semelhante aproximação. Há mesmo dificuldade em regular com segurança as variações de temperatura, na gradação que se pretende, durante os períodos determinados de avanço.

Utilizámos neste género de trabalhos uma estufa construída, para satisfazer os nossos quesitos, pela firma «Chas. Hearson & C.^o», de Londres. Entretanto a-pesar-da sua perfeição, do preciso funcionamento do seu termostato, ainda encontrámos obstáculos no decorrer das nossas pesquisas.

Evidentemente não nos preocupa apenas obter com frequência mutações. Tal objectivo foi já atingido com a técnica primeiramente

apontada; e julgamos que não deixará dúvidas de que o processo adoptado é eficaz na «*Drosophila pseudo-obscura*». Agora, o que forçosamente nos tem de interessar é o princípio postulado por Jollos sobre a direcção da mutação.

Conquanto a espécie em que trabalhamos não seja tão favorável como a «*Drosophila*» *melanogaster*, por não dispormos nela, conforme já referimos, de séries alelomórficas numerosas, como são por exemplo as séries ensaiadas por Jollos—do «white» e do «sooty»—julgamos de lôda a conveniência insistir em procurar essa evidência, da mutação dirigida, na «*Drosophila*» *pseudo-obscura*. Demais conhecemos hoje, por amável indicação de Jollos, a técnica que actualmente êle segue na indução de mutações. Temos portanto a possibilidade de aproximar das suas as nossas condições de experimentação, e de reduzir por êsse facto as dificuldades encontradas na comparação dos resultados. Como Jollos, porém, não deu ainda publicidade ao seu novo método, não podemos aludir por enquanto aos nossos trabalhos mais recentes, a-pesar-de termos já obtido nessa nova linha de estudos alguns dados interessantes.

A princípio utilizámos duas linhas de «*Drosophila pseudo-obscura*» uma *Pointed* (P, 1—0), *yellow* (y, 1,62), *vermillion* (v, 1,72) e *Knobby* (K, V, ?) e outra do tipo *selvagem*, designada no «Institute of Animal Genetics», da Universidade de Edimburgo, pelo número 99.17. Escolhemos então a linha Pyv.K porque em investigações anteriores havíamos reconhecido que esta linha era dotada duma certa mutabilidade. Supúnhamos assim que as pesquisas deveriam ter por êste motivo maior interêsse e que os mutantes se haviam de suceder com maior facilidade. A-pesar-de não ficar confirmada totalmente a nossa suspeição, encontraram-se ainda alguns resultados curiosos.

Nesta primeira série de ensaios, a qual serviu principalmente de indicação e guia para escolha de técnicas apropriadas, conseguimos encontrar as seguintes variações: «*eyeless*» (3 vezes), «*aeroplane*» (uma vez), «*scutellar*» (uma vez) e uma forma de olhos claros que não foi possível identificar.

O carácter «*eyeless*» não se mostrou idêntico ao que nós conhecíamos sob êste nome na «*Drosophila pseudo-obscura*». A irregularidade era tão manifesta que até supusemos derivar de qualquer modificação do carácter «*Knobby*». Estando êste ainda muito mal estudado parecia lógico conceber que em consequência do meio, so-

fresse variações fenotípicas semelhantes ao carácter «eyeless». Quer isto dizer que o desaparecimento completo ou quasi completo dos olhos, verificado após a sujeição ao calor, poderia ser atribuído única e exclusivamente à simples variação flutuante dentro desta linha «Knobby». Devemos salientar mais que nas testemunhas não nos appareceu nenhum individuo desprovido de olhos, ao passo que nas culturas tratadas este carácter appareceu repetidamente, por três vezes. Todavia as gerações que se obtiveram a partir destes individuos apresentavam alguns fenotipos «eyeless», numa proporção que ainda não pôde ser esclarecida.

O «*aeroplane*»—carácter evidenciado pela disposição lateral das asas, segundo direcção normal ao eixo do corpo,—appareceu igualmente como consequência do tratamento. Este mostrou-se recessivo autosómico e idêntico ao «*aeroplane*» já conhecido. Com efeito depois de cruzado com uma fêmea «*aeroplane*» das linhas que o laboratório possuía, deu toda a geração «*aeroplane*».

Da mesma maneira o «*scutellar*» não ofereceu dúvida alguma. Era bem caracterizadamente o carácter já revelado, do gene ligado ao sexo.

Finalmente o carácter «olhos claros»—a última variação encontrada—não pôde ser estudado, porquanto o individuo que o apresentava era estéril. Tratava-se duma fêmea, apparecida logo após o desenvolvimento das larvas tratadas, o que é absolutamente estranho. Significa o aparecimento desta fêmea que a mutação se teria de verificar simultaneamente nos dois cromosomas, o que é caso difícil de explicar. O carácter era essencialmente distinto de tudo quanto nesta espécie conhecíamos. Aproximava-se da coloração que se pode obter por inter-acção factorial do «*vermilion*» e do «*purple*» 2—alelomorfo de *purple* descrito por Crew e R. Lamy (1932). Era porém nitidamente mais brilhante e mais viva.

Que nós saibamos casos idênticos do aparecimento de fêmeas, («sooty» nesses casos) desenvolvidas directamente das larvas tratadas, foram encontrados por Goldschmidt e por Grossman e Smith (1933). Mas ainda hoje se não apresenta qualquer explicação plausível para este facto. E por infelicidade a confirmação e análise deste carácter não se pôde fazer, de modo que estamos na dúvida se se trataria dum simples efeito somático.

Demais como consequência do tratamento pelas elevadas temperaturas as variações somáticas são frequentíssimas. O carácter «Knobby», por exemplo, é extremamente afectado apresentando-se

por vezes com exagêro que nunca encontrámos nas culturas lestemunhas, mesmo em diferentes condições de humidade.

Uma vez provada a possibilidade de obter na «*Drosophila pseudo-obscura*» mutantes, como resposta ao tratamento aludido, na intenção de investigar o mais profundamente possível aspectos da direcção da mutação, decidimos abandonar esta linha para adoptar exclusivamente linhas da forma selvagem. A razão desta substituição do material derivava da necessidade de procurar simplificar ao máximo a determinação das côres dos olhos. Naquela linha, por ser «yellow» — isto é, *corpo amarelo* — dava-se uma diminuição de pigmentação que dificultava ou impossibilitava uma observação acurada.

Seguimos com estas linhas a técnica já apontada, procedendo às mudanças nos prazos fixados e sujeitando as culturas às temperaturas mencionadas. É curioso desde já relatar que, contra a nossa expectativa, a forma selvagem se mostrou muito mais interessante nestas investigações que a linha Pyv.K.

Nos quadros seguintes vêem-se as cifras totais das môscas observadas e os diversos tratamentos que as originaram. A primeira tabela, que pode ser olhada como termo de comparação, diz respeito aos resultados obtidos com a linha Pyv.K. A segunda apresenta os alcançados com a linha selvagem.

QUADRO I

Linha Pyv.K

Temperatura do tratamento	Duração	Total dos indivíduos observados após a eclosão	N.º de indivíduos observados na F ₁
33° C	14 horas	1.089	7.037
	16 "	1.690	5.963
34° C	18 "	792	3.963
	12 "	376	245
	16 "	34	92
		3.981	17.200

QUADRO II

Linha 99.17—Selvagem

Temperatura do tratamento	Duração	Total dos indivíduos observados após a eclosão	N.º de indivíduos observados na F ₁	N.º de indivíduos observados na F ₂
33º C	12 horas	356	2.751	30.217
	14 "	293	1.369	17.026
	16 "	156	687	8.683
34º C	12 "	221	413	4.322
	14 "	202	308	1.693
	16 "	106	121	608
35º C	12 "	14	—	—
		1.348	5.649	62.549

A propósito destas cifras devemos notar que o número de indivíduos obtidos após o tratamento é por via de regra muito baixo. E mais baixo ainda é o número de môscas férteis. Se juntarmos agora a esta evidente dificuldade a irregularidade desconjuntante de resultados, verificando-se por vezes com temperaturas mais elevadas em tratamentos mais enérgicos o aparecimento de maior percentagem de indivíduos férteis, do que vulgarmente se colhe depois de tratamentos relativamente fracos, fica-se com uma ideia da complexidade da investigação.

Este aspecto das pesquisas dificulta extraordinariamente a determinação de cifras que submetidas aos métodos estatísticos possam ser devidamente interpretadas. Cremos mesmo que seja praticamente impossível, pelo menos por enquanto, com os actuais métodos de experimentação, medir com rigor a energia dos tratamentos pelo maior ou menor número de indivíduos resultantes. Esta é a feição peculiar, ingrata, destes trabalhos, constantemente evidenciada, mas nem sempre posta em relêvo pelos diversos investigadores. Semelhante característica que confunde e desorienta, é naturalmente explicada pela série complexa de factores que intervêm no processo. Infelizmente o experimentador só conhece parte dessa série e mesmo assim mal, por ficar dependente de influências ignoradas do meio, as quais natural-

mente se hão-de desdobrar em aspectos múltiplos, consoante as variações de temperatura. E naturalmente desconhece ainda as transformações obscuras que se hão-de desenrolar no próprio gene, resultantes não só das variações que propositadamente imprimimos, mas também de outras que nos passam despercebidas.

Por outro lado, por muita cautela que haja na preparação do meio nutritivo, desde que se insista em o submeter com os indivíduos ao tratamento, quando é praticamente impossível regular constante a humidade, as culturas hão-de oferecer condições diversas e portanto diverso há-de ser o seu comportamento. É mesmo que fôsse possível obter condições ideais de uniformidade para as culturas tratadas já o paralelo se não podia sustentar para as culturas testemunhas, que estando fora da acção das temperaturas elevadas hão-de forçosamente ter outra humidade. Nestas condições pode haver culturas com excesso de água ao passo que outras não a têm na quantidade bastante.

Pelos motivos expostos torna-se indispensável trabalhar com elevado número de culturas, de modo a obter, com grande número de indivíduos, possibilidade de corrigir certos erros de observação e de experimentação. Assim, podem reduzir-se os defeitos resultantes da irregularidade aparente das culturas e do fraco rendimento em indivíduos férteis. Em contra-partida, porém, aumentam-se as dificuldades na obtenção da homogeneidade necessária dos meios de cultura e prejudica-se a observação, por ser difícil e ingrato o exame de números avultados. As investigações dêste género são de facto excessivamente trabalhosas para um único investigador. A empreender investigações mais dilatadas, ainda com maior número de culturas, é indispensável dispor de auxiliares conhecedores de tãda esta técnica. Isoladamente, o observador é induzido a várias causas de erro. Succedendo-se as culturas, que tem de estudar, vê-se forçado a observar diàriamente algumas centenas de indivíduos. Não é assim impossível que escapem à sua observação, por mais paciente e aguda que seja, alguns mutantes de pequenas características. É mesmo crível que as diversidades dos números citados pelos diversos investigadores resultem em grande parte desta dificuldade. É possível ainda que essas diversidades estejam ligadas a influências que não tenham sido consideradas, como por exemplo a diferença entre as séries tratadas e as séries testemunhas, relativamente à composição genética das linhas, ao grau de selecção realizado, etc. Mas é também possível que tenham origem nos factores psicológicos dos investigadores, os quais, conforme Muller (1952) pôs em relêvo affectam a descoberta de variações visíveis.

Trabalhando-se com uma «*Drosophila*» é-se por mais induzido a procurar instintivamente os caracteres já conhecidos. Na «*Drosophila melanogaster*» este erro, a que naturalmente é levado todo o *drosophilista*, deve ter pouca importância por serem numerosíssimos os mutantes conhecidos, havendo portanto muito mais probabilidades no seu aparecimento do que no aparecimento de caracteres novos. Mas na «*Drosophila pseudo-obscura*» em que ainda são relativamente pouco numerosos os mutantes descobertos é lícito supor que tenha havido deficiências de observação e que tivessem aparecido outros caracteres, pouco salientes, que não puderam ser revelados.

Como se pode ver nas nossas cifras foram estudados: 1.º—da linha Pγv.K («Pointed», «yellow», «vermilion», «Knobby»)—21.181 mós-cas; 2.º—da linha 99.17 (selvagem)—66.546, ou seja um total de 90.727 indivíduos. Quer dizer que foram examinadas um pouco mais de 90.000 mós-cas ou seja quasi trezentas por dia em um ano de trabalho. Evidentemente, se pudéssemos regular o desenvolvimento das culturas de modo que o rendimento diário fôsse o desta cifra, a observação seria sempre acurada e quasi poderíamos afirmar que não havíamos deixado escapar involuntariamente qualquer carácter novo. Mas enquanto houve dias de escassa observação houve outros de intensíssimo trabalho. Isto deve ser razão bastante para justificar talvez a passagem sob o nosso binocular de qualquer mutante que não tenha sido reconhecido. Por outro lado, e agora é erro que nos não pertence, o rendimento de indivíduos mutados é também muito irregular. Há culturas em que não se verifica uma única modificação genotípica, quando há outras, pelo contrário, que, sem justificação aparente, produzem várias alterações, e por vezes com tal frequência que até se chega a supor que, a despeito de tôdas as precauções necessárias, se tivesse verificado qualquer contaminação. Não é fácil perceber as razões que explicam esta irregularidade evidente. Já Jollos havia encontrado coisa semelhante nos seus trabalhos e a êsse propósito declarava que o processo ainda parecia pouco claro.

Não resta dúvida do que o salientado por Jollos é absolutamente verdadeiro. Mas o que também não deixa dúvida, e essa é conclusão do nosso trabalho, é que o tratamento térmico é MEIO ABSOLUTAMENTE EFICAZ para a obtenção de mutações.

Nos nossos ensaios obtivemos os seguintes resultados:

I—Mutantes estudados	singed.....	3
	aeroplane	1
	vermillion	1
	prune	1
	snapt.....	2
	miniature	1
II—Variações n/ estudadas .	beaded.	1
	«plexus» (?).....	1
	abdomen anormal..	9
	membros anormais .	1
	«roughoid» (?)	1
	asas anormais.....	(N.º n/ registado)
	olhos anormais.....	2

Os caracteres referidos *singed*, *aeroplane*, *vermillion*, *prune*, *snapt*, *miniature* e *beaded*, observados após o tratamento, foram devidamente ensaiados e provaram ser caracteres estáveis, fixados, transmissíveis por hereditariedade.

As mutações que poderiam fixar-se através dos cruzamentos, depois da F_2 , não puderam observar-se, visto termos sido forçados a abandonar esse material, por ser totalmente impossível trabalhar, em períodos relativamente tão curtos, um tão avultado número de indivíduos.

Os mutantes *singed*, *prune*, *snapt*, *miniature* e *beaded* revelaram-se idênticos aos mutantes já conhecidos na «*Drosophila*» pseudo-obscura, sob estas designações. Os três primeiros caracteres apareceram em machos, os dois últimos em fêmeas. Tanto os machos *snapt* como o *prune* surgiram na F_1 de indivíduos que provinham de larvas tratadas a 34° C. durante 16 horas. Deverá assim deduzir-se que as mutações ocorreram em larvas que originaram fêmeas. A constituição destas fêmeas deveria ser respectivamente após o tratamento $\frac{+}{sp}$ e $\frac{+}{pn}$ para o primeiro cromosoma. De facto estas fêmeas, quando

cruzadas com machos do tipo selvagem, deveriam gerar machos do tipo selvagem e do tipo mutante considerado, em iguais proporções.

O terceiro carácter atrás mencionado—*singed*—surdiu por três vezes em machos; da primeira vez numa F_1 e depois em duas segundas gerações. Todos resultavam de indivíduos tratados a 34° C. durante 14 horas.

As alterações genotípicas *beaded* e *miniature* apareceram como dissemos em fêmeas. A primeira numa F_2 provindo de larvas sujeitas a 34° C. durante 16 horas; a segunda numa F_2 também, mas em resultado dum tratamento a 34° C. durante 14 horas.

O carácter *aeroplane* que surgiu variadas vezes não se mostrou sempre fixado. À excepção dum único caso, revelou-se mera variação flutuante, do tipo frequente das irregularidades ocasionadas pelas altas temperaturas. Duma vez, porém, deu-se o aparecimento numa F_2 duma fêmea *aeroplane*, que cruzada com um macho *aeroplane* deu toda a descendência com este fenotipo.

O carácter *plexus*, obtido ainda num macho, foi de todas as alterações genotípicas a que mais curiosidade nos despertou. Obteve-se logo após o tratamento de 35° C. Infelizmente não pudemos ensaiar este indivíduo porque era estéril. Não há dúvida porém que o carácter era absolutamente semelhante ao conhecido *plexus*, com a quarta nervura das asas claramente alargada em delta junto à margem, e até com todas as manifestações fenotípicas secundárias próprias deste mutante, como seja o enrolamento e a textura delicada das asas.

Seria realmente interessante poder ensaiar este indivíduo e conseguir verificar se se tratava do carácter designado da mesma maneira e bem conhecido na «*Drosophila pseudo-obscura*». Supondo-se que este «plexus» não é devido a um gene mas sim a uma inversão cromossômica, como a experimentação tem comprovado, logo se compreende o interesse que haveria em verificar se a acção térmica poderia desencadear um efeito tão profundo. É crível, conforme foi sugerido por Plough e Ives (1932), que a acção das elevadas temperaturas se faça sentir tanto sobre os cromossomas como sobre o citoplasma. Mas o que já não é de aceitar, sem confirmação de ordem genética ou citológica, é que a influência da temperatura seja tão enérgica que possa induzir variações cromossômicas do tipo apontado. De toda a maneira parece tão interessante este aspecto particular da influência da temperatura que decidimos empreender investigações citológicas em indivíduos tratados da maneira referida.

O carácter *vermilion* apareceu num macho em seguida ao tratamento. Por esta razão suspeitamos como se calcula que se tratasse duma simples variação flutuante. Ensaiado, porém, esse macho com fêmeas «vermilion» deu toda a descendência «vermilion». Ora há a certeza absoluta de que, com as precauções que foram tomadas, as moscas que examinamos nunca sofreram cruzamentos acidentais, provindo exclusivamente das larvas sujeitas ao calor. Demais no nosso

caso é fácil provar que o macho «vermilion» não podia nunca resultar de uma contaminação. Cada cultura provinha do cruzamento de uma única fêmea e de um único macho da linha selvagem, que havíamos seleccionado previamente com o objectivo destes ensaios. As larvas resultantes eram sujeitas à elevada temperatura, e nunca mais se abriam os frascos senão para serem examinadas as moscas obtidas. Ora logo na primeira contagem, isto é, no primeiro dia, em que se procedeu à observação de uma determinada cultura, apareceu o mutante «vermilion». Não colhe portanto a ideia de que um indivíduo «vermilion» tivesse entrado acidentalmente. Não só o frasco se não abriu como até ao tempo no laboratório entre o nosso material se não dispunha de linhas «vermilion» sem outros caracteres. As linhas que então possuíamos com «vermilion» tinham também «yellow» e «singed». É assim evidente que se se tratasse de uma contaminação, partindo do princípio que a despeito de todos os cuidados ela se tivesse verificado, nas culturas resultantes haviam fatalmente de aparecer também os caracteres «singed» e «yellow».

Também se não pode supor que se tratasse de uma fêmea heterozigótica para «vermilion» porque, em primeiro lugar, todos os indivíduos genitores foram escrupulosamente seleccionados, e porque, em segundo lugar, mesmo que o seu genotipo fôsse heterozigótico, o que é quasi inverosímil, metade dos machos obtidos seria incontestavelmente «vermilion». Ora como dissemos, na nossa cultura apenas se encontrou um.

Poderia ainda aventar-se que no cruzamento em discussão a fêmea era heterozigótica para v e para um factor letal também ligado ao sexo. Dir-se-ia então que neste caso os machos que recebessem o cromosoma X com «vermilion» e com o factor letal não teriam viabilidade. Claramente teria de se justificar por esta sugestão o aparecimento de um único macho «vermilion» à custa do «crossing-over» efectuado entre o letal e este gene. Até o aparecimento quasi excepcional de um macho poderia ser tomado como demonstração da íntima aproximação dos «loci» destes dois factores.

Mas todas estas explicações não têm visos de verdade. Se se desse realmente a intervenção do factor letal numa fêmea heterozigótica, os machos da F_1 seriam em número sensivelmente igual a metade do número das fêmeas. Ora o número de machos foi absolutamente idêntico ao número das fêmeas. Logo toda esta hipótese é inconsistente. Há pois a certeza de que não surgiu qualquer erro experimental. O «vermilion» apareceu portanto como resultado de muta-

ção factorial ou genovariação provocada pelo choque térmico sofrido.

Não fica pois sombra de dúvida que se produziram artificialmente mutações na *Drosophila pseudo-obscura* à custa de temperaturas elevadas. Não temos por enquanto elementos seguros, e não saberemos mesmo se os poderemos chegar a obter, para precisar as percentagens em que essas mutações ocorrem. Parece-nos contudo, considerando as cifras alcançadas por outros investigadores, que a mutabilidade da «*Drosophila pseudo-obscura*» se mostra sensivelmente paralela à mutabilidade da *Drosophila melanogaster*.

AGRADECIMENTO

O autor deseja manifestar o seu reconhecimento ao Prof. F. A. E. Crew, Director do «Institute of Animal Genetics», da Universidade de Edimburgo, e Director do «Imperial Bureau of Animal Genetics», por tôdas as facilidades concedidas no decurso do seu estágio, naquele estabelecimento, que lhe permitiram dar início a esta série de investigações. Deseja ainda agradecer a Miss Rawena Lamy e ao Dr. P. Ch. Koller as suas indicações e a cedência do seu material de trabalho.

Bibliografia

- BABCOCK, E. B. AND COLLINS, J. L.—1929—Does natural ionizing radiation control rate of mutation. *Proc. Nat. Acad. Scienc.* **15**: 625-628.
- 1929.—Natural ionizing radiation and the rate of mutation. "*Nature*," **124**: 227-228.
- CREW AND LAMY.—1932—A case of conditioned dominance in *Drosophila obscura*. *Journal of Genetics*. **26**: 351-358.
- DEMEREK, M.—1929—Genetic factors stimulating mutability of the "miniature-gamma," wing character in *Drosophila virilis*. *Proc. Nat. Acad. Sc. Washington*. **15**: 834-838.
- 1931.—Behaviour of two mutable genes of *Delphinium ajacius*. *Journ. Genet.* **24**: 179-193.
- 1933.—What is a gene? *Journ. of Heredity*, XXIV. N.º 10: 369-378.
- FERRY, L., SAPHIRO, N. I. AND SIDOROFF, B. N.—1930—On the influence of temperature on the process of mutation with reference to Goldschmidt's data. *Amer. Natur.* **64**: 570-574.
- GOLDSCHMIDT, R.—1922—Experimentelle Mutationen und das Problem der sorgennanten Parallelinduktion. *Versuche and Drosophila. Biol. Zbl.* **49**: 437-448.
- GROSSMAN, E. F. AND SMITH, T. JR.—1933—Genic modifications in *Drosophila melanogaster* induced by heat irradiation. *Amer. Natur.* LXVII: 429-436.
- HALDANE, J. B. S.—1933—The part played by recurrent mutation in evolution. *Amer. Natur.* LXVII: 5-19.
- JOLLOS, V.—1930, a.—Die experimentelle Auslösung von mutation und ihre Redenten für das Evolutions problem. *Biol. Ab. Kaiser Wilhel. Gessel.* 17.
- 1930, b.—Studien zum evolutions-problem. Über die experimentelle Hervorrufung und Steigerung von mutationen bei *Drosophila melanogaster* *Biol. Zbl.* **50**: 541-554.
- 1931.—Gerichte mutationen und hire Bedeutung für das evolutions-pro-

blem Ervidering auf L. Plates—"Bemerkungen zuden jollos schem Orthomutationen von Drosophila. Biol. Zentralb. **51**, Haft 3.

———1932.—Weitere untersuchungen ü ihre die experimentelle Auslösung erblicher Veränderungen bei Drosophila melanogaster. Zeits. Ind. Abs. Vererb. LXII: 15-23.

JOLY, J. AND DIXON, H. H.—1929.—Cosmic radiations and evolutions. Nat. **123**: 198

JUST, E. E.—1932—On the origin of mutations. Amer. Nat. LXVI: 61-74.

KOLLER, P. CH.—1932—Constitution of the X-chromosome in Drosophila obscura. Nat. **129**: 616.

MULLER, H. J. AND MOTT-SMITH, L. M.—1930—Evidence that natural radioactivity is inadequate to explain the frequency of "natural," mutations. Proc. Nat. Acad. Sci. **16**: 277-285.

MULLER, H. J.—1932—Héribert Nilsson's evidence against the artificial production of mutations. Hereditas XVI: 160-168.

———1932.—Further studies on the nature and causes of gene mutations. Proc. 6th. Int. Cong. Genet. 213-255.

NAVASHIN AND SHKVATNIKOV.—1933—Origin of spontaneous mutations. Nature. **131**: 436.

———1933.—Process of mutation in resting seeds accelerated by increased temperature. Nature vol. **132**: 482-483.

NILSSON, HÉRIBERT.—1932—Über die Induziert Mutabilität. Hereditas XVI: 341-357.

OLSON, A. R. AND LEWIS, G. N.—1928—Natural radioactivity and the origin of species. Nature. **121**: 673-674.

PLATE, L.—1932—Genetik und Abstammungslehre. Zeit. Ind. Abstam. Verebungsl. LXII: 47-67.

PLOUGH, H. H. AND IVES, P. T.—New evidence of the production of mutations by high temperature, with a critique of the concept of directed mutations. Proc. 6th. Int. Cong. Genet. vol. 2: 156-158.

PLOUGH, H. H.—1933—Heat induced mutations in Drosophila and their evolutionary significance. Amer. Natural. LXVII, N.º 708: 63-84.

ROKIZKY, P. TH.—1930—Über das Hervorrufen erblicher Veränderungen bei Drosophila durch Temperature inwirkung. Biol. Zbl. **50**: 554-556.

SCHULTZ, J.—1933—X-rays effects on Drosophila pseudo-obscura. Genetics **18**: 284-291.

TIMOFÉEFF-RESSOVSKY, N. W.—1932—Mutations of the gene in different directions. Proc. 6th. Intern. Cong. Genet. vol. I: 308-330.